

<b>氏 名</b>	<b>MUTAHI, Anne Wacuka</b>
本籍（国籍）	ケニア共和国
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第 765 号
学位授与年月日	令和 2 年 3 月 2 3 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
<b>学位論文題目</b>	<b>Effect of different chemically modified starches on the physico-chemical properties and microstructure of stirred non-fat yoghurt （脱脂ソフトヨーグルトの理化学的特性と微細構造に及ぼす種々の化学修飾澱粉の影響）</b>
学位審査委員	主査 岩手大学教授 三浦 靖 副査 塚本 知玄(岩手 准教授), 中村 正(帯広 准教授), 佐藤 之紀 (弘前 教授)

## 論文の内容の要旨

### Introduction and purpose

Yoghurt is made by fermentation of fresh milk using lactic acid starter cultures to give a pH value of 3.8-4.6. Yoghurt is an excellent source of protein, calcium, phosphorus, riboflavin, thiamin, vitamin B<sub>12</sub>, folate, niacin, magnesium and zinc. In addition, lactose in milk is converted into lactic acid during fermentation, lactose-intolerant people can consume yoghurt without any adverse effect. Low-fat or non-fat yoghurts are popular due to their nutritional characteristics. However, reducing the fat content of yoghurt alters its structural and mechanical characteristics, resulting in poor food texture characteristics and high whey separation. Fat replacers such as skim powder, gelatin and starch are commonly added to increase the total solids content of the milk resulting in desirable low-fat or non-fat yoghurts. Starch is a cost-effective thickening agent widely used in the dairy industry to increase viscosity, improve mouthfeel and reduce syneresis. However, native starch is insoluble in water and does not tolerate high temperatures, shear and acid conditions, making modification necessary to overcome these shortcomings. Hence starch modification improves its functional characteristics. In yoghurt-making, chemically modified starches can exert some positive effect. The use of chemically modified starches for the improvement of physical properties of non-fat stirred yoghurt was investigated.

### Materials and methods

Yoghurts were prepared from non-fat milk powder, sucrose and water. Three types of starches were added to the non-fat yoghurts after fermentation at 1% (w/w). Addition of starches at concentrations higher than 1% resulted in yoghurts that had a visibly unacceptable gritty or grainy consistency. The starches included: tapioca starch acetates

(TSA-1, TSA-2 and TSA-3), tapioca distarch phosphates (TDP-1, TDP-2 and TDP-3) and native tapioca starch with the modified starches varying in degree of substitution. To evaluate the effect of acetylation or cross-linking and level of modification on the starches, acetyl and phosphorus content, degree of substitution, swelling power, molecular weight distribution and RVA analysis for pasting properties were assessed. The influence of these starches on the physico-chemical properties of non-fat yoghurt was also evaluated. This included measurement of titratable acidity, protein content, fat content, syneresis, particle size distribution, flow behavior and dynamic viscoelastic properties of the yoghurts. Furthermore, interactions between milk proteins and modified starches attributed to protein surface hydrophobicity were characterized. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) studies were also conducted to observe the microstructure of the yoghurt.

## Results

Analysis of the starches showed that modification had a significant influence on physico-chemical properties of the starches. The degree of substitution of tapioca starch acetates (TSA-1, TSA-2 and TSA-3) was found to be 0.019, 0.026 and 0.068, respectively. As for the tapioca distarch phosphates (TDP-1, TDP-2 and TDP-3), the degree of substitution was 0.0058, 0.0063 and 0.0081, respectively. Acetylation increased the swelling power and peak viscosity of the tapioca starch, reducing its pasting temperature and reducing the tendency of retrogradation. Cross-linking starch increased pasting temperature and peak viscosity but reduced the swelling power and increased the tendency of retrogradation of the tapioca starch. These characteristics had an impact on the final yoghurt product.

The type of starch and their level of modification were shown to significantly determine the physico-chemical properties of non-fat yoghurts. Particle size analysis showed the formation of protein-starch complexes, as evidenced by the larger particle sizes observed in non-fat yoghurts with starch. This is due to milk proteins adsorbing onto the gelatinized starch granules, which in turn led to a strong casein network. Although protein surface hydrophobicity results showed low hydrophobic interaction values, it can be assumed that other types of interactions such as electrostatic interaction and disulphide bonding had a more significant impact on protein-starch interaction. For the non-fat yoghurts, reduced syneresis and higher values of flow behavior and dynamic viscoelastic parameters were observed in yoghurts with starch acetates. These non-fat yoghurts had lower syneresis and higher viscosity and storage and loss moduli due to greater interaction between starch chains and casein micelles and the swelling of these starches in the serum phase during heating. Results from rheological tests showed that yoghurts with starch acetates exhibited higher yield stress, consistency coefficient ( $K$ ) values, hysteresis loop area, storage modulus ( $G'$ ) and loss modulus ( $G''$ ). By increasing the acetylation level of starch acetates, a decrease in syneresis and higher values in rheological parameters were seen due to a higher number of acetyl groups incorporated that caused more disruption in the intragranular structure. This, in turn, increased the

water binding of starch granules during the heat treatment. Contrary to this, the addition of distarch phosphates to non-fat yoghurt resulted in high syneresis and lower values of rheological parameters. By increasing the level of crosslinking, the non-fat yoghurts had even greater whey separation and lower viscosity, dynamic viscoelastic moduli. A higher degree of cross-linking led to stronger bonding between the starch chains that restricted the swelling of the granules and thus, higher syneresis.

CLSM micrographs of non-fat yoghurts showed densely packed protein in the form of large aggregates surrounded by an aqueous region and with fewer connections between the aggregates. In full-fat and low-fat yoghurts, a homogeneous structure with well-distributed protein connections was observed. The higher level of interactions occurring in the gel network contributed to the less dense gel network with smaller pores, thereby reducing syneresis. The yoghurt microstructure was significantly affected by the type of starch and their interactions with milk proteins. Addition of native and distarch phosphates (especially TDP-3) led to the formation of an interrupted and coarse gel microstructure characterized by larger void spaces and fewer aggregates compared to yoghurts with starch acetates. This resulted in lower viscosity, high syneresis and lower moduli. Starch acetate-added yoghurts had a higher number of aggregates as well as less porosity in the casein network when compared to the native and distarch phosphate-added yoghurts.

#### Conclusion and consideration

This research demonstrated that the type of chemical modification of starch and the level of modification affected the quality of non-fat yoghurt. Incorporating starch acetates induced positive impact on syneresis, flow and viscoelastic properties and microstructure of non-fat yoghurt while an adverse effect was observed with the addition of distarch phosphates when compared to non-fat yoghurt. In addition, the modified starches induced very different microstructure in the non-fat yoghurt. Starch acetates could have enhanced the degree of interactions in the protein network by forming links between protein aggregates resulting in a higher number of aggregates than the other non-fat yoghurts and low serum separation. This led to low syneresis and higher viscosity and moduli values.

This study illustrates that chemically modified starches can serve as functional ingredients in non-fat yoghurt production to improve texture and reduce syneresis, but care has to be taken in the choice of the type of modification as well as the level of modification. TSA-3 starch, with the highest level of acetylation, therefore, is the most suitable stabilizer in non-fat stirred yoghurt. The functionality of TSA-3 starch was demonstrated by its ability to bind water leading to reduced syneresis and interacted with the casein micelles to stabilize the protein network. The opposite effect was observed in non-fat yoghurts with distarch phosphates indicating that these cross-linked starches are not suitable for stirred non-fat yoghurts since they negatively impacted the quality of non-fat yoghurt.

(和訳)

ヨーグルトは、生乳を乳酸菌で発酵させて pH を 3.8~4.6 に調整して製造される。ヨーグルトは、タンパク質やカルシウム、リン、リボフラビン、チアミン、ビタミン B12、葉酸、ナイアシン、マグネシウムおよび亜鉛の供給源として優れている。さらに、牛乳中のラクトースは乳酸発酵中に乳酸に変換されるので、乳糖不耐症者はヨーグルトを何らの不都合もなく喫食できる。低脂肪または脱脂ヨーグルトは、栄養特性の観点から一般的である。しかし、ヨーグルトの脂肪含量の減量は、組織・構造や力学的特性を劣化させるために食品テクスチャーを悪化させるばかりでなく、離水量を増加させてしまう。そこで、脱脂粉乳やゼラチン、澱粉を脂肪代替物として添加して原料乳の固形分含量を増加させることによって低脂肪または脱脂ヨーグルトを改質している。澱粉は、安価な増粘剤であり、食感の改善や離水量を低減するために乳製品工業で広く用いられている。しかし、生澱粉は水に不溶であり、高温や高せん断、酸性環境に対する耐性がないため、これらの欠点を克服するためには澱粉の修飾が必要である。したがって、修飾澱粉（物理修飾、化学修飾）では機能特性が改善されており、ヨーグルト製造においても、化学修飾澱粉（加工澱粉）が活用されている。

本研究では、化学修飾澱粉による脱脂ソフトヨーグルトの理化学的特性の改善効果を検討した。脱脂粉乳、スクロースおよび水からなる再構成乳からヨーグルトを調製した。発酵後の脱脂ヨーグルトに 3 種類の澱粉を 1%(w/w) 添加した。澱粉の添加量が 1%(w/w) を越えるとヨーグルトが目に見えて増粘し、粒子感を感じるようになった。酢酸タピオカ澱粉（アセチル化度が異なる TSA-1, TSA-2, TSA-3）、リン酸架橋タピオカ澱粉（架橋度が異なる TDP-1, TDP-2, TDP-3）および生タピオカ澱粉という 3 種類のタピオカ澱粉を用いた。タピオカ澱粉の化学修飾方法、およびアセチル化度またはリン酸架橋度が膨潤力、分子量分布、RVA（ラピッド・ビスコアライザ）で測定した糊化挙動に及ぼす影響を検討した。これらのタピオカ澱粉が脱脂ソフトヨーグルトの理化学的特性に及ぼす影響も検討した。さらに、当該ヨーグルトの滴定酸度、タンパク質含量、油脂含量、離水量、粒子径分布、流動特性、および動的粘弾性を測定した。さらに、乳タンパク質と化学修飾澱粉との相互作用を乳タンパク質の表面疎水性から検討した。共焦点レーザー走査型顕微鏡（CLSM）でヨーグルトの微細構造を観察した。澱粉の分析から、化学修飾がタピオカ澱粉の理化学的特性に大きく影響を及ぼすことを確認した。3 種類の酢酸タピオカ澱粉のアセチル化度は、それぞれ 0.019, 0.026, 0.068 であった。一方、リン酸架橋タピオカ澱粉のリン酸架橋度は、それぞれ 0.0058, 0.0063, 0.0081 であった。アセチル化度が高い酢酸タピオカ澱粉ほど膨潤力、最高粘度が高く、糊化開始温度が低く、ゲル化が抑制された。一方、架橋度が高いリン酸加工タピオカ澱粉ほど糊化開始温度と最高粘度が高く、膨潤力が小さく、ゲル化が促進された。これらの化学修飾タピオカ澱粉の特性が最終的なヨーグルト製品の特性に影響を及ぼした。

化学修飾の種類と度合いが、脱脂ソフトヨーグルトの理化学的特性に及ぼす影響を検討した。粒子径分布測定において、脱脂ソフトヨーグルトで大粒子が観察されたことは、乳タンパク質-澱粉複合体が形成されたことを示唆している。これは乳タンパク質が糊化した澱粉粒に吸着することによって形成され、ヨーグルト内に形成されるカゼインミセル網目構造をフィラー効果により強化させると考えられた。しかし、乳タンパク質の表面疎水性の結果からは疎水性相互作用が低いことになり、静電的相互作用やジスフィド結合などの相互作用力が乳タンパク質-澱粉相互作用に大きく影響していると推察した。脱脂ソフトヨーグルトでは、酢酸澱粉を添加する離水を抑制し、粘度と動的粘弾性を増加させた。これらの変化は、澱粉鎖とカゼインミ

セルとの相互作用，および連続相での澱粉粒の膨潤度が増加することに起因すると思われる。

詳しく見てみると，酢酸澱粉を添加すると脱脂ソフトヨーグルトの降伏応力，粘稠性定数

(K)，流動曲線の履歴面積，貯蔵弾性率および損失弾性率が増加した。そして，アセチル化度が高い酢酸澱粉を添加すると，離水が抑制され，レオロジー特性（粘度，動的粘弾性）が増加することは，澱粉にアセチル基が導入されると澱粉粒子内構造が破壊されて，水分保持力が増加することに起因していると考えられる。これとは逆に，リン酸架橋タピオカ澱粉を脱脂ソフトヨーグルトに添加すると離水量が増加し，レオロジー特性が減少した。そして，架橋度が高いリン酸架橋タピオカ澱粉の場合ほど離水量が多く，レオロジー特性が低かった。これは，リン酸架橋度が高いと澱粉鎖間の水素結合が強く，澱粉粒の膨潤が抑制されるために水分保持力が低下して離水量が増加すると思われた。

脱脂ソフトヨーグルトの微細構造を CLSM で観察したところ，あまり連結していない大きな凝集体が連続相を取り囲んだ密集構造を呈した。一方，全脂ソフトヨーグルトと低脂肪ソフトヨーグルトでは，タンパク質粒子が均質に分散した構造が観察された。ゲル網目構造単位が高度に相互作用すれば，空隙が小さい均質構造が形成されるので，離水量が減少した。ヨーグルトの微細構造は，添加される澱粉の種類と乳タンパク質との相互作用に大きく影響される。生タピオカ澱粉やリン酸架橋タピオカ澱粉（特に架橋度が高い TDP-3）の添加により，酢酸澱粉の場合に比較して空隙が大きく，数少ない凝集体が断続的な密集構造を形成した。このことから，粘度と弾性率が低く，離水量が多くなると考えられる。一方，酢酸タピオカ澱粉を添加した脱脂ソフトヨーグルトでは，生タピオカ澱粉やリン酸架橋澱粉を添加した場合に比べて，多くの凝集体と少ない空隙からなる網目構造が形成された。

本研究では，タピオカ澱粉に対する化学修飾の種類と度合いは，脱脂ソフトヨーグルトの品質に影響することを示した。酢酸タピオカ澱粉の添加には，脱脂ソフトヨーグルトの離水，流動特性，粘弾性および微細構造に対して改善効果があったが，リン酸架橋タピオカ澱粉の場合には負の影響を及ぼした。化学修飾タピオカ澱粉の添加は，脱脂ソフトヨーグルトの微細構造に非常に異なる影響を及ぼした。酢酸タピオカ澱粉は，乳タンパク質網目構造での構造単位である乳タンパク質凝集体間の相互作用を促進して凝集体の数を増加させるので，離水量を減少させ，粘度と弾性率を増加させた。

本研究は，化学修飾澱粉が脱脂ヨーグルト製造における食品テクスチャーを改善し，離水を抑制する機能素材として使用できるが，化学修飾の種類と度合いに注意しなければならないことを明らかにした。アセチル化度が本研究での最高である TSA-3 は，脱脂ソフトヨーグルトの品質安定化に好適であった。TSA-3 の機能は，その水分保持力による離水抑制，ならびにカゼインミセルとの相互作用によるタンパク質網目構造の安定化によってもたらされると考察した。これとは逆の影響が，リン酸架橋タピオカ澱粉の添加により見られたので，脱脂ソフトヨーグルトの品質に対して好ましくないと結論付けられた。

## 論文審査の結果の要旨

ヨーグルトの脂肪含量の減量は，組織・構造や力学的特性を劣化させるために食品テクスチャー（総合的な物理的食感）を悪化させるばかりでなく，離水量を増加させてしまう。そこで，本研究では化学修飾澱粉による脱脂ソフトヨーグルトの理化学的特性の改善効果を検討した。脱脂粉乳，スクロースおよび水からなる再構成乳からヨーグルトを調製した。発酵後の脱脂ヨ

ーグルトに3種類の澱粉を1%(w/w)添加した。澱粉の添加量が1%(w/w)を越えるとヨーグルトが増粘し、粒子感を感じるようになった。酢酸タピオカ澱粉（アセチル化度が異なる TSA-1, TSA-2, TSA-3）、リン酸架橋タピオカ澱粉（架橋度が異なる TDP-1, TDP-2, TDP-3）および生タピオカ澱粉という3種類のタピオカ澱粉を用いた。タピオカ澱粉の化学修飾方法、およびアセチル化度またはリン酸架橋度が膨潤力、分子量分布、RVA（ラピッド・ビスコア ナライザ）で測定した糊化挙動に及ぼす影響を検討した。これらのタピオカ澱粉が脱脂ソフトヨーグルトの理化学的特性に及ぼす影響も検討した。さらに、当該ヨーグルトの滴定酸度、タンパク質含量、油脂含量、離水量、粒子径分布、流動特性、および動的粘弾性を測定した。さらに、乳タンパク質と化学修飾澱粉との相互作用を乳タンパク質の表面疎水性から検討した。共焦点レーザー走査型顕微鏡でヨーグルトの微細構造を観察した。

酢酸タピオカ澱粉の添加には、脱脂ソフトヨーグルトの離水、流動特性、粘弾性および微細構造に対して改善効果があったが、リン架橋タピオカ澱粉の場合には負の影響を及ぼした。化学修飾タピオカ澱粉の添加は、脱脂ソフトヨーグルトの微細構造に非常に異なる影響を及ぼした。酢酸タピオカ澱粉は、乳タンパク質網目構造での構造単位である乳タンパク質凝集体間の相互作用を促進して凝集体の数を増加させるので、離水量を減少させ、粘度と弾性率を増加させた。アセチル化度が本研究での最高である TSA-3 は、脱脂ソフトヨーグルトの品質安定化に好適であった。TSA-3 の機能は、その水分保持力による離水抑制、ならびにカゼインミセルとの相互作用によるタンパク質網目構造の安定化によってもたらされると考察した。

以上のように、本論文は化学修飾澱粉が有する脱脂ソフトヨーグルトに対する食品テクスチャーの改善効果、および離水の低減効果の分子論的な解明に寄与している。本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士（農学）の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

主論文

1. Mutahi, A. W. and Miura, M. (2020) Effect of different chemically modified starches on rheological properties of stirred non-fat yoghurt. *Food Science and Technology Research* **26**(1), 177-184 (2020).